

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

PCT Rec'd 19 FEB 2002

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14407 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 1/00 [DE/DE]; Riedgrasweg 70, 70599 Stuttgart (DE). MAIER, Klaus [DE/DE]; Paracelsusstrasse 79, 70599 Stuttgart (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07763
- (22) Internationales Anmeldedatum: 10. August 2000 (10.08.2000) (74) Anwälte: OTTEN, Hajo usw.; Witte, Weller & Partner, Postfach 105462, 70047 Stuttgart (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) Angaben zur Priorität: 199 39 246.3 19. August 1999 (19.08.1999) DE Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): M-PHASYS GMBH [DE/DE]; Vor dem Kreuzberg 17, 72070 Tübingen (DE).
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KIEFER, Hans

(54) Title: REFOLDING OF MEMBRANE PROTEINS

(54) Bezeichnung: RÜCKFALTUNG VON MEMBRANPROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing membrane proteins or receptors which are refolded into their native structure. According to said method, solubilized proteins are firstly made available in a first detergent. In order to induce the refolding of the proteins into their native form, the first detergent is replaced by a second detergent. Examples are provided for both the first and second detergents.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zur Herstellung von in ihre native Struktur gefalteten Membranproteinen oder Rezeptoren werden zunächst in einem ersten Detergens sozubilisierte Proteine bereitgestellt. Um eine Faltung der Proteine in ihre native Form zu induzieren, wird das erste Detergens gegen ein zweites Detergens ausgetauscht. Sowohl für das erste als auch für das zweite Detergens werden Beispiele angegeben.

WO 01/14407 A2

Rückfaltung von Membranproteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen aus der Gruppe, die Membranproteine, insbesondere Rezeptoren, vorzugsweise aus der Familie der G-proteingekoppelten Rezeptoren, sowie Teilsequenzen, homologe Sequenzen, mutierte Sequenzen und abgeleitete Sequenzen der Membranproteine und Rezeptoren umfaßt, mit den Schritten:

- Bereitstellen von in einem ersten Detergens solubilisiertem Protein, und
- Austausch des ersten Detergens' gegen ein zweites Detergens, das die Faltung des Proteins in dessen native oder aktive Form induziert.

Für Membranproteine ist ein derartiges Verfahren aus dem Artikel "Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography", Rogl et al. in FEBS Letters 432 (1998) 21-26, bekannt.

Ein Verfahren zur Rückfaltung von Rezeptorprotein ist aus dem Artikel "Expression of an Olfactory Receptor in *Escherichia coli*: Purification, Reconstitution, and Ligand Binding" von Kiefer et al. in Biochemistry 35 (1996) 16077-16084, bekannt.

Den beiden Veröffentlichungen liegt das Problem zugrunde, daß Membranproteine, zu denen auch die Rezeptoren gehören, zwar in großer Menge mit Hilfe von Expressionsvektoren in Bakterien produziert werden können, daß das produzierte Protein jedoch nicht "aktiv" ist. Das Protein wird nämlich nicht in die Membran integriert sondern liegt zunächst im denaturierten Zustand vor und muß durch einen Detergensaustausch in die native oder aktive Struktur (rück)gefaltet werden. Die Aggregate von "inaktivem" Protein werden in der englischsprachigen Literatur als inclusion bodies bezeichnet.

Für die Membranproteine Toc75 und LHCP beschreiben Rogl et al. ein Verfahren, bei dem als erstes Detergens N-Lauroylsarcosin und als zweites Detergens Triton X-100® verwendet wurden. Durch den Austausch des chaotropen durch das milde Detergens ergab sich eine Rückfaltung des aggregierten Proteins.

Gemäß Kiefer et al. wurde ein G-proteingekoppelter Geruchsrezeptor durch Detergensaustausch von N-Lauroylsarcosin in Digitonin während der Bindung an eine Nickelsäule in die aktive Struktur überführt.

In beiden Fällen konnte gezeigt werden, daß das zunächst in Form von inclusion bodies vorliegende aggregierte Protein zunächst in einem denaturierenden Detergens solubilisiert und dann durch den beschriebenen Detergensaustausch in seine aktive Struktur überführt werden konnte, die durch entsprechende Bindungsmessungen verifiziert wurde.

An Membranproteinen, insbesondere an Rezeptoren in nativer oder aktiver Form besteht nicht nur wissenschaftliches sondern auch großes kommerzielles Interesse, denn die Membranproteine sind Bestandteile aller biologischen Membranen und verleihen den verschiedenen zellulären Membranen ihre Spezifität, sind insbesondere für den Stoff- und Reizaustausch verantwortlich.

Die spezifische Erkennung einer chemischen Verbindung durch den zugehörigen Rezeptor hat z.B. zur Folge, daß die Zielzelle ihren physiologischen Zustand ändert. Darum sind Rezeptoren die wichtigsten Zielmoleküle für Medikamente, ca. 3/4 aller im Handel befindlichen Pharmaka wirken auf Rezeptoren, die meisten davon wiederum auf sogenannte G-proteingekoppelte Rezeptoren, die im menschlichen Genom mehrere hundert Vertreter haben.

Für die Entwicklung von spezifischen Antikörpern, von Medikamenten etc. ist es vor diesem Hintergrund sehr wünschenswert, Membranproteine, insbesondere Rezeptoren in aktiver oder nativer Struktur in großen Mengen zur Verfügung zu haben. Da diese Proteine im Gewebe jedoch nur in sehr geringer Konzentration vorkommen, ist es erforderlich, ein System zur rekombinanten Überexpression der Membranproteine und Rezeptoren einzusetzen. Hierzu kann zum einen in eukaryotischen Zellen (Säuger- oder Insektenzellen) funktionelles Protein erzeugt werden, die Sy-

stem sind jedoch teuer, und die Expressionsraten sind niedrig, was ebenfalls von Nachteil ist. Auch bei der bakteriellen Expression kann man funktionelles Protein erhalten, allerdings ist hier die Expressionsrate in der Regel noch niedriger als bei eukaryotischer Expression.

Vor diesem Hintergrund beschreiben die beiden eingangs erwähnten Veröffentlichungen Verfahren, bei denen das Protein im Zellinneren exprimiert wird, wo es jedoch aggregiert, also nicht funktionell vorliegt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß sehr große Mengen an Protein hergestellt werden können, Kiefer et al. berichten, daß bis zu 10 % des Zellproteins und damit 100-10.000 mal mehr Protein als mit anderen Expressionssystemen hergestellt werden kann. Die dabei erzeugten inclusion bodies, über die auch Rogl et al. berichten, müssen dann zunächst solubilisiert und durch den eingangs bereits beschriebenen Detergensaustausch in ihre native oder aktive Struktur überführt werden.

Selbstverständlich richtet sich das kommerzielle Interesse nicht nur auf Membranproteine und Rezeptoren in ihrer natürlich vorkommenden Sequenz, vielmehr sind auch Teilsequenzen, homologe Sequenzen, mutierte Sequenzen oder abgeleitete Sequenzen von Membranproteinen und Rezeptoren Gegenstand dieser Erfindung, denn sie ermöglichen je nach Funktionalität nicht nur Einblicke in die Struktur von Membranproteinen und Rezeptoren, sondern auch ein rationales Medikamentendesign.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die DNA-Sequenz für viele Rezeptoren bekannt ist, derartige Sequenzen sind in der EMBL-Datenbank enthalten. Da diese DNA-Sequenzen meistens keine

Introns enthalten, läßt sich die kodierende Sequenz über PCR aus genomischer DNA oder über RT-PCR aus mRNA herstellen. Diese DNA kann dann in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert werden.

Unbekannt ist jedoch die Struktur des Translationsproduktes, so daß die Bereitstellung von erfindungsgegenständlichen Proteinen in ausreichender Menge Kristallisationsexperimente etc. ermöglicht, um die Struktur weiter aufzuklären.

Es sei noch erwähnt, daß eukaryotisch und bakteriell exprimierte Rezeptoren durch die Glykosylierung unterschieden werden können. G-proteingekoppelte Rezeptoren besitzen nämlich am N-Terminus eine oder mehrere Glykosylierungsstellen, die im endoplasmatischen Retikulum oder später in Golgi-Apparat mit einem Oligosaccharid modifiziert werden. Bakterien modifizieren diese Sequenzen dagegen nicht.

Durch Behandlung eines Teil des Proteins mit N-Glykosidase F oder N-Glykosidase A kann der Saccharidanteil abgespalten werden, so daß auf einem SDS-Gel eine unterschiedliche Lauflänge für Protein vor und nach dieser Behandlung zu erkennen ist, wenn das Protein in eukaryotischen Zellen exprimiert wurde. Bei bakteriell exprimiertem Protein sind keine Lauflängenunterschiede erkennbar.

Obwohl die in den eingangs erwähnten Veröffentlichungen beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Membranprotein bzw. Rezeptorprotein zu aktiven Strukturen führen, sind die beschriebenen Verfahren nach Erkenntnis der Erfinder der hier vorliegenden Anmeldung insofern nicht zufriedenstellend, als

die Ausbeute niedrig und das Verfahren schlecht reproduzierbar ist.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, das eingangs erwähnte Verfahren dahingehend weiterzubilden, daß bei guter Reproduzierbarkeit eine hohe Ausbeute des Proteins in aktiver oder nativer Struktur erreicht wird.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß das zweite Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

- Alkyl-N,N-dimethylglycin (Alkyl = C8-C16)
- Alkylglykoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigtkettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide)
- Saccharid-Fettsäureester (bspw. Sucrosemonododecanoat)
- Alkylthioglycoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigtkettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide mit S- statt O-glycosidischer Bindung)
- Gallensäuren (Cholat, Deoxychololat) und Derivate (bspw. CHAPS, CHAPSO)
- Glucamide (MEGA-8 bis -10, HEGA)
- Lecithine und Lysolecithine (bspw. DHPC, C12-Lysolecithin)
- Alkyl-Phosphorylcholin (Alkyl = C10 - C16).

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben nämlich erkannt, daß die geringe Ausbeute und mangelnde Reproduzierbarkeit bei den bekannten Verfahren auf das zweite Detergens zurückzuführen ist. Überraschenderweise ergeben sich nämlich deutlich höhere Ausbeuten und reproduzierbarere Ergebnisse, wenn das zweite Detergens aus der oben erwähnten Gruppe ausgewählt ist. Dabei ist darauf zu achten, daß das zweite Detergens in seiner Endkonzentration oberhalb der kritischen micellaren Konzentration liegt. Dieser cmc-Wert gibt die Konzentration einer amphiphilen Micellen-bildenden Struktur in Wasser an, oberhalb derer sich Micellen bilden. Der cmc-Wert spiegelt also im Prinzip die Löslichkeit eines Detergens' in Wasser wieder. Oberhalb des cmc-Wertes ist die Konzentration gelöster Detergens-Monomere konstant.

Die cmc-Werte einiger Detergentien sind beschrieben in der Veröffentlichung "Detergents: An Overview" J.M. Neugebauer in Methods in Enzymology 182 (1990), Seiten 239-253.

Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn als zweites Detergens Alkyl-Phosphorylcholin mit einer Kettenlänge von C10-C16 eingesetzt wird. Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben erkannt, daß insbesondere bei G-proteingekoppelten Rezeptoren dieses Detergens für eine hohe Proteinausbeute in rückgefalteter Struktur sorgt.

Gemäß eigener Messungen der Erfinder betragen die cmc-Werte für Alkyl-Phosphorylcholin mit einem Alkylrest von C12, C13, C14 bzw. C16 500, 150, 50 bzw. 5 μ M.

Angesichts der Tatsache, daß nur wenige Detergentien überhaupt in der Lage sind, Membranproteine oder gar Rezeptoren stabil in Lösung zu halten, ist es umso überraschender, daß Alkyl-Phosphorylcholin, dessen Verwendung für G-proteingekoppelte Rezeptoren bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde, sogar in der Lage ist, eine Rückfaltung in die native Struktur zu induzieren. Im Falle eines Adenosinrezeptors konnten die Erfinder nachweisen, daß der rückgefaltete Rezeptor native Bindungseigenschaften aufweist, wenn als zweites Detergens Alkyl-Phosphorylcholin eingesetzt wird. Auch für andere Rezeptoren konnte die Rückfaltung mit einem der Detergentien aus der oben genannten Gruppe gezeigt werden.

Dabei ist es bevorzugt, wenn das Protein in Form von inclusion bodies in einer mit einem Expressionsvektor transformierten Zelllinie produziert wird, in den ein für das Protein kodierendes Gen kloniert ist, wobei das Protein vorzugsweise Teil eines Fusionsproteins ist und vor oder nach dem Detergensaustausch von dem Fusionsprotein abgespalten wird.

Die Expression der für das erfindungsgegenständliche Protein kodierenden DNA-Sequenz als Fusionsprotein hat gegenüber der direkten Expression ohne Trägerprotein den Vorteil, daß dieses das gewünschte, jedoch expressionssystemfremde Protein vor Abbau durch Proteasen schützt und zu einem höheren Expressionsniveau führen kann. Insbesondere durch die Verwendung von Glutathion-S-Transferase (GST) als Trägerprotein wird die Löslichkeit von in großen Mengen exprimierten Proteinen in der Wirtszelle erhöht und die Isolierung erleichtert. Das Trägerprotein kann ferner zur Reinigung von Fusionsproteinen benutzt

werden, wenn geeignete Antikörper vorliegen. Gleiches gilt für affinitätschromatographische Reinigungsverfahren.

Dabei ist es weiter bevorzugt, wenn die inclusion bodies aufgereinigt und durch Zusatz des ersten Detergens solubilisiert werden, wobei das erste Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

N-Lauroylsarcosin, Dodecylsulfat, andere geladene Detergentien oder Harnstoff bzw. Guanidiniumchlorid in Kombination mit geladenen oder ungeladenen Detergentien.

Wichtig ist dabei, daß die Bedingungen, um das Protein in Lösung zu bringen, denaturierend sind, so daß sie die Ausbildung der nativen Struktur nicht ermöglichen.

Dabei ist es insgesamt bevorzugt, wenn das zweite Detergens in einem Faltungspuffer mit gemischten Lipid/Detergensmicellen vorliegt, wobei der Faltungspuffer vorzugsweise das zweite Detergens und Phospholipid aus einer natürlichen Quelle, vorzugsweise einen Lipidextrakt aus Gewebe enthält, in dem das Protein natürlicherweise vorkommt.

Hierbei ist von Vorteil, daß gegenüber der Verwendung von reinen Detergensmicellen die Ausbeute an nativem Protein noch verbessert werden kann. Den Lipidextrakt aus dem Gewebe, in dem der Rezeptor natürlicherweise vorkommt, kann man auch simulieren, indem Lipide mit einer ähnlichen Zusammensetzung verwendet oder gemischt werden.

Bezüglich des Detergensaustausches ist es bevorzugt, wenn dieser durch Dialyse- oder Ultrafiltrationsverfahren, bzw. über chromatographische Verfahren oder durch Verdünnen des solubilierten Proteins in einen das zweite Detergens enthaltenden Puffer erfolgt.

Die insoweit beschriebenen Verfahren zum Detergensaustausch sind untereinander austauschbar und bieten jedes für sich spezifische Vorteile bezüglich der Handhabung, der Verfahrensdauer sowie der erreichbaren Ausbeute.

Nach dem Detergensaustausch muß in dem Protein noch zumindest eine konservierte Disulfidbrücke ausgebildet werden, was vorzugsweise durch Zugabe einer Mischung aus oxidiertem und reduziertem Glutathion erfolgt.

Das gefaltete Protein kann ferner in Proteoliposomen eingebaut werden, die künstlich hergestellte Vesikel sind und eine funktionstüchtige Einheit darstellen. Mit Hilfe dieser gezielt hergestellten Proteoliposomen können bestimmte Prozesse an den Membranproteinen/Rezeptoren gezielt untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund betrifft die vorliegende Erfindung ferner Proteoliposomen mit nach dem obigen Verfahren hergestelltem Protein.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Detergens' zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen der oben beschriebenen Art, wobei das Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

- Alkyl-N,N-dimethylglycin (Alkyl = C8-C16)
- Alkylglykoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigtkettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide)
- Saccharid-Fettsäureester (bspw. Sucrosemonododecanoat)
- Alkylthioglycoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigtkettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide mit S- statt O-glycosidischer Bindung)
- Gallensäuren (Cholat, Deoxycholat) und Derivate (bspw. CHAPS, CHAPSO)
- Glucamide (MEGA-8 bis -10, HEGA)
- Lecithine und Lysolecithine (bspw. DHPC, C12-Lysolecithin)
- Alkyl-Phosphorylcholin (Alkyl = C10 - C16).

Weitere Vorteile ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung bevorzugter Ausführungsbeispiele.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beschreibung einzelner Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1: Herstellen eines Expressionsvektors mit cDNA für Rezeptorprotein

Die DNA-Sequenzen für diverse Rezeptorproteine und auch Membranproteine sind in der EMBL-Datenbank enthalten, sie weisen zumeist keine Introns auf. Mit Hilfe von Primern kann also die erforderliche DNA über PCR aus genomischer DNA oder über RT-PCR aus mRNA hergestellt werden.

Diese DNA wird dann in einen Expressionvektor kloniert, der zur Expression eines Fusionsproteins konstruiert wurde. Das Trägerprotein kann bspw. Glutathion-S-Transferase (GST) sein, wie dies in dem eingangs erwähnten Artikel von Kiefer et al. beschrieben ist, wo ein Fusionsprotein aus dem Rezeptor OR5 und GST erzeugt wurde. Der Expressionsvektor wird in eine Zelllinie transformiert, die das Fusionsprotein exprimiert. Das Protein wird dabei nicht in die Membran eingebaut, sondern liegt zumindest zum Teil aggregiert in Form von inclusion bodies in Zytoplasma vor und ist somit nicht korrekt gefaltet.

Beispiel 2: Isolierung von exprimiertem Protein

Die cDNA eines der folgenden Rezeptoren wird in-frame in den Vektor pGEX2a-c-His kloniert: AO-Adenosinrezeptors aus dem Hai *Squalus acanthias*, menschlicher beta-2-adrenerger Rezeptor, menschlicher Neuropeptid YY1-Rezeptor, menschlicher Neuropeptid YY2-Rezeptor, menschlicher Melanocortin-1-Rezeptor, menschlicher Oxytocinrezeptor. Dieser Vektor enthält hinter dem Tac-

Promotor die Sequenz, die für Glutathion-S-Transferase und eine darauffolgende Thrombinspaltstelle kodiert, dann eine Polylinkersequenz und schließlich sechs Histidincodons und ein Stopcodon.

Die Vektoren werden in den E. coli-Stamm BL21 transformiert. Die Proteinexpression wird durch Zugabe von IPTG induziert und die Zellen werden nach weiteren drei Stunden geerntet. Nach Lysozymbehandlung und Ultraschallaufschluß werden die Membranen und inclusion bodies durch Zentrifugation von den löslichen Proteinen abgetrennt.

Beispiel 3: Solubilisierung des Proteins und säulenchromatographischer Detergensaustausch

Die inclusion bodies werden durch Zugabe von 1,5 % N-Lauroylsarcosin bei 0°C solubilisiert und mit einem Puffer (0,1 % Alkyl(C14)phosphorylcholin) auf das fünffache Volumen verdünnt. Zu dieser Lösung gibt man Thrombin und inkubiert 16 Stunden bei 20°C, um den Rezeptor von GST abzuspalten. Anschließend werden unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert.

Der Überstand wird auf Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gegeben und eine Stunde lang bei 4°C inkubiert, wobei der Rezeptor an die Nickelmatrix bindet. Danach überführt man das Nickelmaterial in eine Säule und wäscht zum Detergensaustausch mit einem Puffer, der 0,01 % Alkyl(C14)phosphorylcholin als zweites Detergens enthält. Dadurch werden das N-Lauroylsarcosin (erstes Detergens) und kontaminierende Proteine entfernt.

Beispiel 4: Rekonstitution des Proteins

Zur Rekonstitution löst man eine Lipidmischung, die aus 70 % 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin und 30% 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol besteht, zusammen mit der doppelten (w:w) Menge Dodecylmaltosid in Chloroform und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Darauf gibt man das gereinigte Protein aus Beispiel 3 und inkubiert mindestens eine Stunde lang. Das Detergens wird über eine Polystyrensäule (Calbiosorb von Calbiochem) entfernt, worauf sich Liposomen mit inkorporiertem Rezeptor bilden (Proteoliposomen).

Durch Ligandenbindungsmessungen konnte gezeigt werden, daß der Rezeptor in nativer Struktur vorliegt.

Beispiel 5: Detergensaustausch mit Lipid/Detergensmicellen

Es werden folgende Stammlösungen angesetzt:

- Cholesterol, Sigma C8667, 100 mg/ml in CHCl_3 ,
- Schafhirnphospholipid, Sigma P4264, 100 mg/ml in CHCl_3 ,
- Sojabohnenlecithin, Sigma P3644, 100 mg/ml in CHCl_3 ,
- 100 mg von Alkyl(C16)-Phosphorylcholin in 50 ml-Fläschen, gelöst in 1-2 ml CHCl_3 ; Zugabe von 28 μg Cholesterolstammlösung, 32 μl Schafhirnphospholipid-Stammlösung, 40 μl Sojabohnenlecithin-Stammlösung; CHCl_3 abdampfen und wenigstens 30 Minuten bei weniger als 15 mbar trocknen; Zugabe

von 1 ml Wasser, um eine klare Lösung zu erhalten (Detergens-Stammlösung, 100 mg/ml)

- Thrombin, Sigma T4648, 1.000 u/ml in H₂O, gelagert bei -20°C
- Sarcosyl: 10 % N-Lauroylsarcosin in H₂O, autoklaviert
- 10 x PBS: 200 mM Natriumphosphat, 1,5 M NaCl, pH 7,0

2 ml 3 % Sarcosyl werden in PBS aufgenommen und auf Eis gelagert. 2 ml inclusion bodies aus Beispiel 2 zugeben und schütteln sowie eine Minute mit Ultraschall behandeln. Unmittelbar danach 16 ml 0,1 % Detergens-Stammlösung in PBS hinzugeben.

Bereits hier erfolgt ein Detergensaustausch, Sarcosyl wird unter den cmc-Wert verdünnt, während die Endkonzentration von Alkyl(C16)phosphorylcholin oberhalb des cmc-Wertes liegt.

Nach Zugabe von 15 u Thrombin wird die Lösung über Nacht bei 20°C gehalten, um das Fusionsprotein zu spalten.

Danach wird die Lösung für 30 Minuten bei 4°C mit 40.000 UPM zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Zu dem Überstand werden 20 mM Imidazol aus einer 1 M-Stammlösung (pH 7,0) hinzugegeben. Diese Lösung wird zu entsprechend aufgereinigtem Säulenmaterial Ni-NTA superflow (Qiagen) hinzugegeben und in einem Kühlraum (4-8°C) für eine Stunde mäßig rotiert, um ein Absetzen des Materials zu verhin-

dern. Auf diese Weise bindet das Rezeptorprotein an das Säulenmaterial.

Danach wird das Säulenmaterial für eine Minute bei 2.000 UPM zentrifugiert und der Überstand soweit entfernt, daß der verbleibende Überstand dem Bettvolumen entspricht. Ni-NTA Agarose wird aufgenommen und in eine Säule gegeben. Mit einer Flußrate von 2 ml/min wird mit 40 ml einer 0,01 % Detergens-Stammlösung in PBS gewaschen, wodurch ein weiterer Detergensaustausch unter Beachtung der cmc-Werte erfolgt.

Die Säule wird dann mit 10 ml von PBS/0,01 % Detergens-Stammlösung/0,3 M Imidazol eluiert und die bei 280 nm absorbierenden Fraktionen gesammelt.

Daraufhin erfolgt für vier Stunden eine Dialyse gegen 2. l PBS bei 4°C, sowie Zugabe von 1 mM GSH/0,1 mM GSSG aus einer 100 x Stammlösung in Wasser.

Die Lösung wird dann für 48 Stunden bei 4°C gelagert, woraufhin durch Flußdialyse die Adenosinbindung nachweisbar war, der Rezeptor lag also in nativer Form vor.

Beispiel 6: Rückfaltung des beta-2-adrenergen Rezeptors durch Detergensaustausch ohne Reinigung des Proteins

Die inclusion bodies mit enthaltenem beta-2-adrenergen Rezeptor aus Beispiel 2 werden durch Zugabe von 1,5% N-Lauroylsarcosin bei 0°C solubilisiert und mit dem 10fachen Volumen einer Lösung von 0,1% Dodecyl- β -D-maltosid in 20mM Na-Malonatpuffer pH 6,0

verdünnt. Anschliessend wird Thrombin (50 Einheiten pro Milligramm Protein) zugegeben und eine Stunde lang bei 20°C inkubiert. Nach Zentrifugation gibt man den Überstand auf einen Lipidfilm wie in Beispiel 4 und rekonstituiert das Protein in Proteoliposomen.

Die erfolgreiche Rückfaltung wird durch Messung der Bindung eines fluoreszierenden Liganden des beta-adrenergen Rezeptors (BODIPY-TMR-CGP 12177 von Molecular Probes) nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen aus der Gruppe, die Membranproteine, insbesondere Rezeptoren, vorzugsweise aus der Familie der G-proteingekoppelten Rezeptoren, sowie Teilsequenzen, homologe Sequenzen, mutierte Sequenzen und abgeleitete Sequenzen der Membranproteine und Rezeptoren umfaßt, mit den Schritten:

- Bereitstellen von in einem ersten Detergens solubilisiertem Protein, und
- Austausch des ersten Detergens' gegen ein zweites Detergens, das eine Faltung des Proteins in dessen native oder aktive Form induziert,

dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

- Alkyl-N,N-dimethylglycin (Alkyl = C8-C16)
- Alkylglykoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigtkettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide)

- Saccharid-Fettsäureester (bspw. Sucrosemonododecanoat)
 - Alkylthioglycoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide mit S- statt O-glycosidischer Bindung)
 - Gallensäuren (Cholat, Deoxycholat) und Derivate (bspw. CHAPS, CHAPSO)
 - Glucamide (MEGA-8 bis -10, HEGA)
 - Lecithine und Lysolecithine (bspw. DHPC, C12-Lysolecithin)
 - Alkyl-Phosphorylcholin (Alkyl = C10 - C16).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Detergens in einem Faltungspuffer mit gemischten Lipid/Detergensmicellen vorliegt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Faltungspuffer das zweite Detergens und Phospholipid aus einer natürlichen Quelle, vorzugsweise einen Lipidextrakt aus Gewebe enthält, in dem das Protein natürlicherweise vorkommt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Detergensaustausch durch Dialyse- oder Ultrafiltrationsverfahren erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Detergensaustausch über ein chromatographisches Verfahren erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Detergensaustausch durch Verdünnen des solubilisierten Proteins in einen das zweite Detergens enthaltenden Puffer erfolgt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Detergensaustausch in dem Protein zumindest eine konservierte Disulfidbrücke ausgebildet wird, vorzugsweise durch Zugabe einer Mischung aus oxidiertem und reduziertem Glutathion.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das gefaltete Protein in Proteoliposomen eingebaut wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein in Form von inclusion bodies in einer mit einem Expressionsvektor transformierten Zelllinie produziert wird, in den ein für das Protein kodierendes Gen kloniert ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Teil eines Fusionsproteins

ist und vor oder nach dem Detergensaustausch von dem Fusionsprotein abgespalten wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die inclusion bodies aufgereinigt und durch Zusatz des ersten Detergens solubilisiert werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das erste Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe N-Lauroylsarcosin, Dodecylsulfat, andere geladene Detergentien oder Harnstoff bzw. Guanidiniumchlorid in Kombination mit geladenen oder ungeladenen Detergentien.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Detergens oberhalb der kritischen micellaren Konzentration eingesetzt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß als zweites Detergens Alkyl-Phosphorylcholin mit einer Kettenlänge von C10-C16 eingesetzt wird.
15. Proteoliposomen mit nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 hergestelltem Protein.
16. Verwendung eines Detergens zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen aus der Gruppe, die Membranproteine, insbesondere Rezeptoren, vorzugsweise aus der Familie der G-proteingekoppelten Rezeptoren, sowie Teilsequenzen, homologe Sequenzen, mutierte

Sequenzen und abgeleitete Sequenzen der Membranproteine und Rezeptoren umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß das Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

- Alkyl-N,N-dimethylglycin (Alkyl = C8-C16)
- Alkylglykoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide)
- Saccharid-Fettsäureester (bspw. Sucrosemonododecanoat)
- Alkylthioglycoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide mit S- statt O-glycosidischer Bindung)
- Gallensäuren (Cholat, Deoxycholat) und Derivate (bspw. CHAPS, CHAPSO)
- Glucamide (MEGA-8 bis -10, HEGA)
- Lecithine und Lysolecithine (bspw. DHPC, C12-Lysolecithin)
- Alkyl-Phosphorylcholin (Alkyl = C10 - C16).

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM

GEBIET DES PATENTWESEN

P10/PCT Rec'd 19 FEB 2002

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

OTTEN, Hajo
WITTE, WELLER & PARTNER
Postfach 105462
70047 Stuttgart
ALLEMAGNE

WITTE, WELLER & PARTNER
Patentanwälte
13. Dez. 2001
Frist: notiert:

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 29.11.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
3443P100WO HO/sw

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP00/07763

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
10/08/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
19/08/1999

Anmelder
M-PHASYS GMBH

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cardenas, C

Tel. +31 70 340-3370



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)


Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 3443P100WO HO/sw	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07763	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 19/08/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K1/00		
Anmelder M-PHASYG GMBH		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 10/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 29.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter Masturzo, P Tel. Nr. +31 70 340 2275



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-17 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 eingegangen am 14/11/2001 mit Schreiben vom 09/11/2001

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07763

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	15-16
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	15-16
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: Biochemical Society Transactions 27, Juli 1999, S. A141;

D2: FEBS Letters, 432, SS. 21-26;

D3: J. Biol.Chem. 262(10), pages 4486-44-91 (1987);

D4: J. Biol.Chem. 267(9) pages 5811-16 (1992);

D5: Biochemistry 35, pages 16077-16084 (1996);

D6: EP-A-334278 (Bredt & Fuchte);

D7: DE-A-3014189 (EMBL);

D8: WO-A-940057 (Pasteur Mérieux);

D9: EP-A-321606 (Immuno AG);

D10: WO-A-9810789 (Connaught).

D10 wurde fälschlich im Recherchenbericht als WO-A-9819789 erwähnt.

Die vom Anmelder vorgeführte Argumente und Beschränkungen genügen, die Neuheit und erfinderische Tätigkeit für den Gegenstand der Ansprüche 1 bis 14 zu gewährleisten. In Gegenteil werden Ansprüche 15 und 16 beanstandet, da dessen Gegenstand nicht neu bzw. erfinderisch ist. In der Tat sind in D1 und D5 gereinigte und rückfaltete, G-protein-geküppelten Rezeptoren, die in Fettliposome rekonstituiert werden sind. Übrigens ist die Rekonstituierung in Liposome die übliche Weise, Membranprotein (worunter Rezeptoren) in reinem Zustand zu bereiten. Außerdem wird der Gebrauch von Alkylglykosiden in Rückfaltung von G-protein-geküppelten Rezeptoren in D1 and D5 erwähnt.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Der Anmelder hat nicht verdeutlicht, was unter "Teilsequenzen, homologe Sequenzen usw." (Ansprüche 1 und 16) zu verstehen ist. Daher werden Ansprüche 1 und 16 laut Art. 6 und Regel 6 PCT beanstandet, da sie nicht vollständig deutlich sind

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07763

PCT/EP00/07763

M-phasys GmbH

09. November 2001

3443P100WO HO/MF-uh

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen aus der Familie der G-proteingekoppelten Rezeptoren, von Teilsequenzen, homologen Sequenzen, mutierten Sequenzen und abgeleiteten Sequenzen der G-proteingekoppelten Rezeptoren, mit den Schritten:
 - Bereitstellen von in einem ersten Detergens solubilisiertem Protein, und
 - Austausch des ersten Detergens' gegen ein zweites Detergens, das eine Faltung des Proteins in dessen native oder aktive Form induziert,dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Detergens ausgewählt ist aus den Alkylglykosiden (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = alle Mono- und Disaccharide) und den Alkyl-Phosphorylcholinen (Alkyl = C10 - C16).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Detergens in einem Faltungspuffer mit gemischten Lipid/Detergensmicellen vorliegt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Faltungspuffer das zweite Detergens und Phospholipid aus einer natürlichen Quelle, vorzugsweise einen Lipidextrakt aus Gewebe, enthält, in dem das Protein natürlicherweise vorkommt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Detergensaustausch durch Dialyse- oder Ultrafiltrationsverfahren erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Detergensaustausch über ein chromatographisches Verfahren erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Detergensaustausch durch Verdünnen des solubilisierten Proteins in einen das zweite Detergens enthaltenden Puffer erfolgt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Detergensaustausch in dem Protein zumindest eine konservierte Disulfidbrücke ausgebildet wird, vorzugsweise durch Zugabe einer Mischung aus oxidiertem und reduziertem Glutathion.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das gefaltete Protein in Proteoliposomen eingebaut wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein in Form von inclusion bodies

in einer mit einem Expressionsvektor transformierten Zelllinie produziert wird, in den ein für das Protein kodierendes Gen kloniert ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Teil eines Fusionsproteins ist und vor oder nach dem Detergensaustausch von dem Fusionsprotein abgespalten wird.
11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die inclusion bodies aufgereinigt und durch Zusatz des ersten Detergens solubilisiert werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das erste Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe N-Lauroylsarcosin, Dodecylsulfat, andere geladene Detergentien oder Harnstoff bzw. Guanidiniumchlorid in Kombination mit geladenen oder ungeladenen Detergentien.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Detergens oberhalb der kritischen micellaren Konzentration eingesetzt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß als zweites Detergens Alkyl-Phosphorylcholin mit einer Kettenlänge von C10-C16 eingesetzt wird.
15. Proteoliposomen mit nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 hergestelltem Protein.

16. Verwendung eines Detergens' zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen aus der Familie der G-proteingekoppelten Rezeptoren, von Teilssequenzen, homologen Sequenzen, mutierten Sequenzen und abgeleiteten Sequenzen der G-proteingekoppelten Rezeptoren, dadurch gekennzeichnet, daß das Detergens ausgewählt ist aus den Alkylglykosiden (Alkyl = C5-C12, auch verzweigtkettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide) und den Alkyl-Phosphorylcholinen (Alkyl = C10 - C16).

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
FÜR DAS GEBIET DES PATENTWESSENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An
WITTE, WELLER & PARTNER
z.H. OTTEN, Hajo
Postfach 105462
70047 Stuttgart
GERMANY


MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

PTO/PCT Rec'd 19 FEB 2002

(Regel 44.1 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 3443P100WO HO/sw ✓	Absendedatum (Tag/Monat/Jahr) 28/03/2001
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 07763 ✓	WEITERES VORGEHEN siehe Punkte 1 und 4 unten
Anmelder M-PHASYS GMBH	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/08/2000 ✓

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.
Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:
Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):
Bis wann sind Änderungen einzureichen?
Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.
Wo sind Änderungen einzureichen?
Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35
Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.
2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.
3. ☐ **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß
☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.
☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.
4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:
Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90^{bis} bzw. 90^{bis} vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.
Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.
Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Geertruida Groeneveld-Van der Spek

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K1/113

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	H ROGL ET AL.: "Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilized by nickel chelating chromatography" FEBS LETTERS, Bd. 432, Nr. 1, 1998, Seiten 21-26, XP002130408 AMSTERDAM NL in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
✓ X	H KIEFER ET AL.: "Expression of an olfactory receptor in Escherichia coli: purification, reconstitution and ligand binding" BIOCHEMISTRY., Bd. 35, Nr. 50, 1996, Seiten 16077-16084, XP002130409 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA., US ISSN: 0006-2960 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-16
✓ X	WO 98 19789 A (CONNAUGHT) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument ---	1-16
✓ X	EP 0 334 278 A (BREDT ET AL.) 27. September 1989 (1989-09-27) Anspruch 1 ---	1-16
✓ X	WO 95 03069 A (NORTH AMERICAN VACCINE INC.) 2. Februar 1995 (1995-02-02) Beispiel 6 ---	1-16
✓ X	DE 30 14 189 A (K SIMONS & A HELENIUS) 15. Oktober 1981 (1981-10-15) das ganze Dokument ---	1-16
✓ X	WO 94 00557 A (CNRS) 6. Januar 1994 (1994-01-06) das ganze Dokument ---	1-16
✓ X	S TANDON & P M HOROWITZ: "Detergent assisted refolding of guanidinium chloride-denatured" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 262, Nr. 10, 1987, Seiten 4486-4491, XP002089255 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ---	16
✓ X	G ZARDENETA & P M HOROWITZ: "Micelle-assisted protein folding" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 267, Nr. 25, 1992, Seiten 5811-5816, XP000262801 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ---	16

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
✓ X	EP 0 321 606 A (IMMUNO AG) 28. Juni 1989 (1989-06-28) das ganze Dokument ---	16
✓ O,P, X	H KIEFER ET AL.: "Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in Escherichia coli" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS., Bd. 27, Nr. 6, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 908-912, XP000991446 COLCHESTER, ESSEX, GB ISSN: 0300-5127 das ganze Dokument ---	1-16
O,X	H KIEFER ET AL.: "Refolding of G protein-coupled receptors from inclusion bodies " BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS., Bd. 27, Juli 1999 (1999-07), Seite A141 XP002162857 COLCHESTER, ESSEX, GB ISSN: 0300-5127 das ganze Dokument -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

T/EP 00/07763

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9819789 A	14-05-1998	US 6103933 A AU 4662297 A EP 0946283 A	15-08-2000 29-05-1998 06-10-1999
EP 334278 A	27-09-1989	DE 3809796 A AU 615523 B AU 3158189 A JP 2036193 A US 5084561 A	05-10-1989 03-10-1991 28-09-1989 06-02-1990 28-01-1992
WO 9503069 A	02-02-1995	US 6153406 A AU 698458 B AU 7514494 A BR 9407144 A CA 2167808 A EP 0724455 A FI 960308 A JP 9500537 T NO 960255 A NZ 271500 A PL 312700 A	28-11-2000 29-10-1998 20-02-1995 17-09-1996 02-02-1995 07-08-1996 22-03-1996 21-01-1997 22-03-1996 24-11-1997 13-05-1996
DE 3014189 A	15-10-1981	EP 0037931 A JP 56161331 A US 4356169 A	21-10-1981 11-12-1981 26-10-1982
WO 9400557 A	06-01-1994	FR 2692898 A AU 4504793 A	31-12-1993 24-01-1994
EP 321606 A	28-06-1989	AT 95188 T DE 3787654 D DK 628188 A FI 885629 A, B, FI 953141 A, B, JP 2000798 A JP 2656098 B NO 175782 B	15-10-1993 04-11-1993 24-06-1989 24-06-1989 22-06-1995 05-01-1990 24-09-1997 29-08-1994

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 3443P100WO HO/sw	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 07763	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/08/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 19/08/1999
Anmelder M-PHASYG GMBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

RÜCKFALTUNG VON MEMBRANPROTEINEN DURCH VERWENDUNG ZWEIER UNTERSCHIEDLICHEN
DETERGENTIEN

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. --



wie vom Anmelder vorgeschlagen



keine der Abb.



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen. Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19(1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Übersetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlaufende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Translation



PATENT COOPERATION TREATY

10/069,433

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3

Applicant's or agent's file reference 3443P100WO HO/sw	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/07763	International filing date (day/month/year) 10 August 2000 (10.08.00)	Priority date (day/month/year) 19 August 1999 (19.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K1/00		
Applicant M-PHASYS GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>4</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 10 March 2001 (10.03.01)	Date of completion of this report 29 November 2001 (29.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/07763

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-17, as originally filed.
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-16, filed with the letter of 09 November 2001 (09.11.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07763

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims	15-16	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-14	YES
	Claims	15-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

- D1: Biochemical Society Transactions 27, July 1999, page A141
 - D2: FEBS Letters, 432, pages 21-26
 - D3: J. Biol. Chem. 262(10), pages 4486-4491 (1987)
 - D4: J. Biol. Chem. 267(9), pages 5811-5816 (1992)
 - D5: Biochemistry 35, pages 16077-16084 (1996)
 - D6: EP-A-334 278 (Bredt & Fuchte)
 - D7: DE-A-3 014 189 (EMBL)
 - D8: WO-A-94/0057 (Pasteur Mérieux)
 - D9: EP-A-321 606 (Immuno AG)
 - D10: WO-A-98/10789
- D10 was incorrectly cited as WO-A-98/19789 in the search report.

The arguments and restrictions presented by the applicant are adequate to ensure the novelty and inventive step for the subject matter of Claims 1 to 14. In contrast, objections are raised to Claims 15 and 16 because the subject matter of these claims is not novel or inventive. D1 and D5 include purified and refolded G-protein-coupled receptors that have been reconstituted in fatty liposomes. Incidentally, the reconstitution in liposomes is the usual way to prepare membrane proteins (including receptors) in a pure condition. Furthermore, the use of alkyl glycosides in refolding of G protein-coupled receptors is mentioned in D1 and D5.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07763

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The applicant has not made clear how the expression "partial sequences, homologous sequences etc." (Claims 1 and 16) should be understood. Therefore an objection is raised to Claims 1 and 16 within the meaning of PCT Article 6 and PCT Rule 6 since these claims are not completely clear.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 16 May 2001 (16.05.01)	Applicant's or agent's file reference 3443P100WO HO/sw
International application No. PCT/EP00/07763	Priority date (day/month/year) 19 August 1999 (19.08.99)
International filing date (day/month/year) 10 August 2000 (10.08.00)	
Applicant KIEFER, Hans et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
10 March 2001 (10.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Juan Cruz Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07763

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K1/113

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	H ROGL ET AL.: "Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilized by nickel chelating chromatography" FEBS LETTERS, Bd. 432, Nr. 1, 1998, Seiten 21-26, XP002130408 AMSTERDAM NL in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-16

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	H KIEFER ET AL.: "Expression of an olfactory receptor in Escherichia coli: purification, reconstitution and ligand binding" BIOCHEMISTRY., Bd. 35, Nr. 50, 1996, Seiten 16077-16084, XP002130409 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA., US ISSN: 0006-2960 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-16
X	WO 98 19789 A (CONNAUGHT) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument ---	1-16
X	EP 0 334 278 A (BREDT ET AL.) 27. September 1989 (1989-09-27) Anspruch 1 ---	1-16
X	WO 95 03069 A (NORTH AMERICAN VACCINE INC.) 2. Februar 1995 (1995-02-02) Beispiel 6 ---	1-16
X	DE 30 14 189 A (K SIMONS & A HELENIUS) 15. Oktober 1981 (1981-10-15) das ganze Dokument ---	1-16
X	WO 94 00557 A (CNRS) 6. Januar 1994 (1994-01-06) das ganze Dokument ---	1-16
X	S TANDON & P M HOROWITZ: "Detergent assisted refolding of guanidinium chloride-denatured" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 262, Nr. 10, 1987, Seiten 4486-4491, XP002089255 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ---	16
X	G ZARDENETA & P M HOROWITZ: "Micelle-assisted protein folding" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 267, Nr. 25, 1992, Seiten 5811-5816, XP000262801 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ---	16

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07763

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 321 606 A (IMMUNO AG) 28. Juni 1989 (1989-06-28) das ganze Dokument ---	16
O,P, X	H KIEFER ET AL.: "Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in Escherichia coli" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS., Bd. 27, Nr. 6, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 908-912, XP000991446 COLCHESTER, ESSEX, GB ISSN: 0300-5127 das ganze Dokument ---	1-16
O,X	H KIEFER ET AL.: "Refolding of G protein-coupled receptors from inclusion bodies " BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS., Bd. 27, Juli 1999 (1999-07), Seite A141 XP002162857 COLCHESTER, ESSEX, GB ISSN: 0300-5127 das ganze Dokument -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In. tionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07763

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9819789 A	14-05-1998	US 6103933 A AU 4662297 A EP 0946283 A	15-08-2000 29-05-1998 06-10-1999
EP 334278 A	27-09-1989	DE 3809796 A AU 615523 B AU 3158189 A JP 2036193 A US 5084561 A	05-10-1989 03-10-1991 28-09-1989 06-02-1990 28-01-1992
WO 9503069 A	02-02-1995	US 6153406 A AU 698458 B AU 7514494 A BR 9407144 A CA 2167808 A EP 0724455 A FI 960308 A JP 9500537 T NO 960255 A NZ 271500 A PL 312700 A	28-11-2000 29-10-1998 20-02-1995 17-09-1996 02-02-1995 07-08-1996 22-03-1996 21-01-1997 22-03-1996 24-11-1997 13-05-1996
DE 3014189 A	15-10-1981	EP 0037931 A JP 56161331 A US 4356169 A	21-10-1981 11-12-1981 26-10-1982
WO 9400557 A	06-01-1994	FR 2692898 A AU 4504793 A	31-12-1993 24-01-1994
EP 321606 A	28-06-1989	AT 95188 T DE 3787654 D DK 628188 A FI 885629 A,B, FI 953141 A,B, JP 2000798 A JP 2656098 B NO 175782 B	15-10-1993 04-11-1993 24-06-1989 24-06-1989 22-06-1995 05-01-1990 24-09-1997 29-08-1994